

00/486086<sup>K6</sup>

PCT/JP98/02993

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

02.07.98

5  
1

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

REC'D 21 AUG 1998

WIPO PCT

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1997年 8月20日

出 願 番 号  
Application Number:

平成 9年特許願第223651号

出 願 人  
Applicant(s):

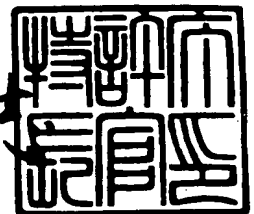
株式会社ディナバック研究所

PRIORITY DOCUMENT

1998年 8月 7日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平10-3062512

【書類名】 特許願

【整理番号】 D3-906

【提出日】 平成 9年 8月20日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 癌治療用ベクター

【請求項の数】 13

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社ディナベック研究所内

    【氏名】 横井 治彦

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社ディナベック研究所内

    【氏名】 武田 勝男

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社ディナベック研究所内

    【氏名】 長谷川 護

【特許出願人】

    【識別番号】 595155107

    【氏名又は名称】 株式会社ディナベック研究所

    【代表者】 中富 博隆

【代理人】

    【識別番号】 100102978

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 清水 初志

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9706980

【プルーフの要否】 要

【請求項10】 特定の転写因子がガン抑制遺伝子の遺伝子産物であり、任意の遺伝子が自殺酵素をコードする遺伝子である、請求項1記載のベクター。

【請求項11】 ガン抑制遺伝子がp53遺伝子である、請求項10記載のベクター。

【請求項12】 請求項1～11のいずれかに記載のベクターのいずれかが導入された宿主細胞。

【請求項13】 請求項1～11のいずれかに記載のベクターをインビトロで宿主細胞内に導入することを特徴とする、特定の転写因子が存在しない細胞を選択的に死滅させる方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、特定の転写因子が存在しない細胞に特異的に遺伝子を発現させる技術及びその癌治療への応用に関し、遺伝子治療などの分野に属する。

【0002】

【従来の技術】

癌とは、体細胞の変異あるいはウィルス感染等により細胞増殖の制御メカニズムが変調し、その結果細胞が無秩序に増殖し、さらに周辺の組織へ侵入・占領することで個体を死にいたらしめる疾病である。細胞の増殖は、それを促進する方向に働く遺伝子と、それを抑制する遺伝子の働きのバランスにより制御される。癌細胞では多くの場合、遺伝子の変化、即ち前者の遺伝子（原癌遺伝子とも呼ばれる、例えばras、myc、ablなど）が変異などを受けて異常に活性が高まるか、あるいは後者の遺伝子（癌抑制遺伝子とも呼ばれる、例えば、Rb、p53、APCなど）が変異やウィルス遺伝子の作用などにより不活化されるかして、増殖制御のメカニズムが変化している。これら癌関連遺伝子のうち、特にp53とよばれる癌抑制遺伝子は、これまで調べられた癌細胞の約半数で変異を受けていることが明らかになっており、p53の機能失活と発癌との関連性が非常に注目されている（Levineら、1997、Cell、88巻、323-331頁）。

【0003】

ところで近年のDNA分子の運搬物（ベクター）の開発が進むにつれ、遺伝子治療が現実のものとなり、その最も大きなターゲットとして癌への応用が研究されている。その戦略は大きく、①サイトカイン遺伝子を導入して癌細胞に対する免疫能を高める方法、②抗癌剤の感受性が高い骨髄細胞にMDRのような保護遺伝子を導入して感受性を下げ、より強力な化学療法を可能にする方法、③癌細胞を自殺に導く遺伝子を導入する方法、などに分けられる（Davisら、1996、Curr.Opin.Oncol., 8巻、499-508頁）。このうち特に③の戦略では、選択性、即ち癌細胞では高い殺細胞効果を与えるが正常細胞への毒性がほとんどないことが望まれる。そのため、癌細胞に特異的に（自殺）遺伝子を発現させる方法の開発が行われている。

#### 【0004】

癌細胞に特異的な遺伝子発現系の代表的なものとしては、正常細胞に比べて癌細胞で発現の高い遺伝子のプロモーターを利用する方法が知られている。例えば、肝癌の多くで高発現を示すAFP（ $\alpha$ -fetoprotein）遺伝子のプロモーター（玉置ら、1995、蛋白質核酸酵素、40巻、17号、2613-2617頁）、メラノーマの多くで高発現を示すチロシナーゼ遺伝子のプロモーター（Vileら、1993、Cancer Res., 53巻、3860-64頁）、乳癌と膵臓癌の多くで高発現を示すerbB2遺伝子のプロモーター（Harrisら、1994、Gene Ther., 1巻、170-175頁）、前立腺癌の多くで高発現を示すPSA（prostate specific antigen）遺伝子のプロモーター（Pangら、1995、Hum. Gene Ther., 6巻、1417-26頁）などが対応する癌の種類に特異的な遺伝子発現を与えることが示されている。しかしながら、これらのプロモーターはごく一部の癌にのみ適用可能であり、また全ての癌でこのようなプロモーターが同定されているわけではない。さらに、これらのプロモーターによる遺伝子発現では絶対的な発現量は必ずしも高くない。

#### 【0005】

また、多くの癌でその機能異常が認められているp53を癌に特異的な遺伝子発現系に応用する試みもなされている。例えば、最近公開されたBalmainらのシステムがあげられる（Balmainら、W097/12970）。このシステムは、目的遺伝子を発現させるプロモーターとして「癌細胞（あるいはp53の機能がない細胞）で発

現が高まる」プロモーター（例えばhsp70遺伝子のプロモーター）を用いることと、目的遺伝子の発現を「down-regulation」する遺伝子（配列特異的転写サプレッサー、リボザイム、アンチセンス遺伝子）をp53依存プロモーターの支配下に発現させる第2のユニットを用いることを特徴としている。これら2つのユニットを細胞に導入したとき、正常細胞では目的遺伝子の発現を支配するプロモーターの活性が弱く、さらにp53依存にサプレッサー（またはアンチセンス、リボザイム）が発現するので目的遺伝子の発現がこれによっても抑制される。これに対して癌細胞では、目的遺伝子の発現を支配するプロモーターの活性が強く、さらにp53依存の転写サプレッサー（またはアンチセンス、リボザイム）の発現が低いのでそれによる目的遺伝子の発現の抑制もない。従って、その二重の効果で癌細胞特異的な遺伝子発現が期待できる、としている。しかしながら、公報に記載の実施例ではその特異性は低いといえる。この原因の一つは、目的遺伝子の発現を「down-regulation」するのに、転写以降のステップを抑制する手段（転写サプレッサー、リボザイム、アンチセンス）を用いたことによる、と考えられる。これらの手段では、目的遺伝子につながれたプロモーターが高い発現を与えない場合には、ある程度の効果は期待できるが、プロモーターの強度が増すほど、効果が低下する。従って、これら手段を用いる限り、実際の遺伝子治療に用いる高い発現強度と特異性は期待できないと考えられる。

#### 【0006】

また、大腸菌のCre-loxP組換え系の性質を組み合わせた癌特異的発現系も考案されている（佐藤ら、1997、第3回日本遺伝子治療学会講演要旨集、p49）。Creは、大腸菌のP1ファージの配列特異的なDNA組換え酵素であり、loxPはその標的配列である。CreはloxP配列を認識し、2つのloxP間でのDNA分子の組換えを行うため、この性質を利用して、大腸菌内だけでなく哺乳類細胞においても、遺伝子発現のスイッチのON/OFFが可能であることが知られている（Kilbyら、1993、Trends Genet., 9巻、413-421頁）。佐藤らの発現系においては、Creにより目的遺伝子が発現させるシステム「スイッチONシステム」が用いられている。すなわち、肝癌細胞特異的なAFPプロモーターの支配下にCre遺伝子が発現させるユニット、および、発現目的遺伝子とそのプロモーターの間にlox-転写終結シグナル-loxなる

配列を挿入したユニットが用いられている。これら2つのユニットを細胞に導入したとき、肝癌細胞ではCreの発現が高いためlox間の組換えが多く起こり、その結果転写終結シグナルが切り離されて目的遺伝子の発現が高まる。これに対して、肝癌以外の細胞ではCreの発現が低いのでlox間の組換えもあまり起こらず、目的遺伝子の発現も低い。それらの結果、AFPプロモーターの特異性は殆ど保たれたままで、発現強度が50-100倍高められた発現系が作出されたとされている。しかしながら、このシステムにおいては、発現強度の問題点は克服されているが、もう一つの問題である適用範囲については解決されていない。また、このような「スイッチONシステム」では、肝癌以外の細胞でも、わずかに起こる（肝癌細胞の1/100程度）AFPプロモーターからのCre発現のため、時間の経過と共に目的遺伝子の発現が高まり、特異性の面でも問題がある。この結果、例えば、目的遺伝子として自殺遺伝子を用いた場合、正常細胞への毒性が高まる懸念がある。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、特定の転写因子が存在しない細胞に特異的に任意の遺伝子を発現させる技術を提供することを課題とする。さらに、この技術を利用した、癌細胞に高い特異性を有し、正常細胞に対する悪影響が少ない、遺伝子発現技術を提供することを課題とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、特定の転写因子に依存するプロモーターの下流に組み換え酵素遺伝子を配置した組み換え酵素の発現ユニットと、他のプロモーターの下流に発現させるべき所望の遺伝子と組換え酵素の2つの標的配列を配置したユニットとを作製し、これらユニットを細胞に感染させることにより、特定の転写因子が存在する細胞では組み換え酵素が発現し認識配列間の組換えが起こるため目的遺伝子が欠失して遺伝子の発現が起こらないが、特定の転写因子が存在しない細胞では組み換え酵素が発現せず認識配列間の組換えが起こらないため目的遺伝子の発現が引き起こされるという、特定の転写因子が存在しない細胞に特異的な遺伝子発現技術を見いだすに至った。

## 【0009】

さらに、本発明者等は、この遺伝子発現技術の癌治療への応用につき鋭意研究を行った結果、特定の転写因子に依存するプロモーターとして癌抑制因子に依存するプロモーターを用い、発現させる所望の遺伝子として自殺遺伝子など癌細胞に毒性を示す遺伝子を用いることにより、癌細胞（癌抑制因子が存在しない細胞）特異的に毒性を示す遺伝子を発現させ、癌細胞を選択的に死滅させることが可能であることを見いだした。

## 【0010】

即ち、本発明は、特定の転写因子が存在しない細胞に特異的な遺伝子発現技術、およびその癌治療への利用に関し、より具体的には、

1. (1) 特定の転写因子の存在下で作動するプロモーターと該プロモーター支配下に存在する組換え酵素をコードする遺伝子、(2) 発現可能な任意の遺伝子と該遺伝子周辺に存在する組換え酵素の2つの標的配列（但し、該2つの標的配列の間で組換えが起こった際に、該任意の遺伝子の発現が起こらなくなるように、該任意の遺伝子と該2つの標的配列が配置されている）とを有するベクター、
2. (1) 特定の転写因子の存在下で作動するプロモーターと該プロモーター支配下に存在する組換え酵素をコードする遺伝子と(2) 発現可能な任意の遺伝子と該遺伝子周辺に存在する組換え酵素の2つの標的配列とが同一分子上に存在する、(1) 記載のベクター、
3. (1) 特定の転写因子の存在下で作動するプロモーターと該プロモーター支配下に存在する組換え酵素をコードする遺伝子と(2) 発現可能な任意の遺伝子と該遺伝子周辺に存在する組換え酵素の2つの標的配列とが異なる分子上に存在する、(1) 記載のベクター、
4. 任意の遺伝子が、組換え酵素の2つの標的配列に挟まれている、(1) 記載のベクター、
5. 任意の遺伝子を支配するプロモーターが、組換え酵素の2つの標的配列に挟まれている、(4) 記載のベクター、
6. 特定の転写因子がガン抑制遺伝子の翻訳産物である、(1) 記載のベクター、



7. ガン抑制遺伝子がp53遺伝子である、(6)記載のベクター、
8. 組換え酵素がCreであり、組換え酵素の標的配列がloxである、(1)記載のベクター、
9. 任意の遺伝子が自殺酵素をコードする遺伝子である、(1)記載のベクター、
10. 特定の転写因子がガン抑制遺伝子の遺伝子産物であり、任意の遺伝子が自殺酵素をコードする遺伝子である、(1)記載のベクター、
11. ガン抑制遺伝子がp53遺伝子である、(10)記載のベクター、
12. (1)～(11)に記載のベクターのいずれかが導入された宿主細胞、
13. (1)～(11)に記載のベクターをインビトロで宿主内に導入することを特徴とする、特定の転写因子が存在しない細胞を選択的に死滅させる方法、に関する。

【0011】

なお、本発明において「転写因子」とは、特定の遺伝子の発現を促進する活性を有するタンパク質を指し、転写活性を失ったものは含まれない。また、本発明の「ベクター」は、1分子のベクターのみならず、2分子のベクターをも指す。さらに、本発明において「自殺遺伝子」とは、細胞を死に導くタンパク質またはRNAをコードする遺伝子を指し、それ自身が細胞を死に導くタンパク質またはRNAをコードする遺伝子（例えば、ジフテリアトキシン等の毒素遺伝子や、baxのようなアポトシス誘導遺伝子）および細胞毒性の低い化合物を毒性の高い化合物に変換する酵素の遺伝子（例えば、単純ヘルペスウィルス由来チミジンキナーゼ遺伝子や大腸菌由来シトシンデアミナーゼ遺伝子）を含む。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明のベクターは、(1)特定の転写因子の存在下で作動するプロモーターと該プロモーター支配下に存在する組換え酵素をコードする遺伝子（以下、「第一ユニット」と称する）と発現可能な任意の遺伝子と該遺伝子周辺に存在する組換え酵素の2つの標的配列（以下、「第二ユニット」と称する）とを有する。

【0013】

このため、導入される細胞内にベクター上のプロモーターを活性化する転写因子が存在する場合、「第一ユニット」が機能して、組み換え酵素遺伝子が発現する。これに続いて、発現した組み換え酵素が、「第二ユニット」における任意の遺伝子の周辺に配置された2つの認識配列間の組み換えを引き起こし、任意の遺伝子が不可逆的に発現不可能となる。一方、ベクターが導入される細胞内にプロモーターを活性化する転写因子が存在しない場合には、「第一ユニット」において組み換え酵素の遺伝子が発現しないため、「第二ユニット」が機能して、任意の遺伝子が発現する。

## 【0014】

従って、本発明のベクターを用いれば、特定の転写因子が存在する細胞において任意の遺伝子の発現を抑制することができる一方、特定の転写因子が存在しない細胞で任意の遺伝子を発現させることができる。なお、「第一ユニット」と「第二ユニット」は、一分子のベクター内に存在してもよく、それぞれ異なる分子のベクターに存在していてもよい。

## 【0015】

本発明のベクターの「第一ユニット」のプロモーターに作用する「特定の転写因子」としては、「第二ユニット」の任意の遺伝子を発現させたい所望の細胞に存在せず、任意の遺伝子の発現を抑制したい所望の細胞に存在する転写因子であれば特に制限はない。例えば、癌抑制の機能を有する転写因子としては、多くの癌細胞において変異していることが知られているp53タンパク質、ウィルムス腫瘍や急性白血病で変異が見られるWT1 (Haberら、1990、Cell、61巻、1257-69頁; Underwoodら、1996、Blood、87巻、2171-79頁) などを用いることが可能である。「プロモーター」としては、例えば転写因子がp53であれば、その支配下にあるWAF1遺伝子 (El-Dieryら、1993、Cell、75巻、817-825頁) やbax遺伝子 (Miyashitaら、1993、Cell、80巻、293-299頁) などの遺伝子のプロモーター、もしくは人工的に合成されたp53の結合コンセンサス配列 (El-Dieryら、1992、Nature Genet.、1巻、45-49頁) を含むプロモーターを、転写因子がWT1であれば、その支配下にあるインシュリン様成長因子2型遺伝子 (Nicholsら、1995、Cancer Res.、55巻、4540-4543 頁) などのプロモーター、もしくは人工的に合成され

たWT1の結合コンセンサス配列 (Nakagamaら、1995、Mol. Cell. Biol., 15巻、1489-1498頁) を含むプロモーターを用いることが可能である。また、該プロモーターの支配下に存在する「組換え酵素をコードする遺伝子」としては、大腸菌P1ファージの組換え酵素Creの遺伝子や、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の組換え酵素FLP、酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) の組換え酵素Rなどの遺伝子が挙げられる (Kilbyら、1993、Trends Genet., 9巻、413-421頁)。好ましくは、37℃での組換え効率の良いCreの遺伝子が用いられる (Buchholzら、1996、Nucleic Acids Res., 24巻、4256-4262頁)。

#### 【0016】

また、本発明のベクターの「第二ユニット」における「発現可能な任意の遺伝子」としては、通常、プロモーターの下流に接続された任意の遺伝子である。「第二ユニット」において用いられるプロモーター (いわゆるエンハンサー部分も含む) としては、動物細胞で機能するものなら、いかなるものでも用いることができる。好適には、広範な種類の細胞で強力な発現を与えるもの、例えば、E1a遺伝子のプロモーター (Zabnerら、1996、Gene Ther., 3巻、458-465頁)、サイトメガロウイルスの初期遺伝子のプロモーター (Dollら、1996、Gene Ther., 3巻、437-447頁) や、ニワトリのアクチン遺伝子のプロモーターにサイトメガロウイルスの初期遺伝子のエンハンサーを接続したCAGプロモーター (Niwaら、1991、Gene, 108巻、193-200頁) などが用いられる。目的によっては、組織特異的に強い発現を与えるプロモーターを用いることが出来る。任意の遺伝子としては、例えば、第一ユニットのプロモーターが癌抑制因子が結合するプロモーターであれば、癌細胞の殺傷のため、ジフテリアトキシンA鎖遺伝子 (Maxwellら、1986、Cancer Res. 46巻、4660-4664頁)、単純ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ遺伝子 (Fieldら、1983、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80巻、4139-4143頁)、大腸菌由来シトシンデアミナーゼ遺伝子 (Mullenら、1992、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89巻、33-37頁) などの自殺遺伝子が用いられる。また、「組換え酵素の標的配列」としては、例えば、組換え酵素がCreであればloxP配列であり、FLPであればFRT配列であり、RであればR-target配列である (Kilbyら、1993、Trends Genet., 9巻、413-421頁)。組換え酵素の標的配列は、二つの標的配

列の間で組換えが起こった際に、上記の任意の遺伝子の発現が起こらなくなるように配置されている。例えば、二つの標的配列は、任意の遺伝子を挟み込む様に配置されていてもよく、また、任意の遺伝子の発現を制御するプロモーターを挟み込むように配置されていても良い。

【0017】

これら二つのユニットを挿入するためのベクターとしては、例えば、遺伝子治療などに用いる場合にはアデノウィルスベクター（Miyakeら、1996、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93巻、1320-1324頁；Kanegaeら、1996、Acta Paediatr. Jpn、38巻、182-188頁）やレトロウィルスベクター（脇本ら、1995、蛋白質核酸酵素、40巻、2508-2513頁）、アデノ随伴ウィルスベクター（玉寄ら、1995、蛋白質核酸酵素、40巻、2532-2538頁）、プラスミドベクター（Zerrouqiら、1996、Cancer Gene Ther.、3巻、385-392頁）などを用いることができる。これらは既に確立された方法で、効率的に生産することが出来る。

【0018】

ベクターが導入される宿主細胞は、例えばベクターを癌治療などに用いる場合には、癌患部の細胞（および、結果的にその周辺の正常細胞）である。本発明のベクターを癌治療に用いる場合、具体的には、例えばプロモーターとしてはp53依存プロモーターを、第2ユニットの遺伝子としては自殺遺伝子である単純ヘルペスウィルス由来チミジンキナーゼ遺伝子を用いる。このベクターは、例えばp53を欠損する癌患部に対し、直接、あるいは血管経由で運搬される。一定時間の後に自殺遺伝子産物の基質であるガンシクロビルを、癌患部周辺、あるいは全身に投与する。癌細胞では自殺遺伝子が発現してガンシクロビルが毒性を発揮し細胞が死滅するが、正常細胞では自殺遺伝子が発現せず、細胞は死滅しない。

また、このベクターは、癌の化学療法強化（Eckertら、1996、Blood、88巻、3407-3415頁）等のための癌患者由来の骨髓細胞の移植の際などに、ex vivoでのp53欠損癌細胞の選択的死滅にも用いることができる。

【0019】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【0020】

## 【実施例】

## 【実施例1】.ベクターの構築

## 1) p53依存発現ユニットの構築

## 1-1) p53結合領域の作製 (図1)

制限酵素BglII、XhoI、SmaI、Asp718、およびSphIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチドBS1 (GATCTCTCGAGCCCGGGGTACCGCATG: 配列番号1) および合成オリゴヌクレオチドSB1 (CGGTACCCCGGGCTCGAGA: 配列番号2) をT4ポリヌクレオチドキナーゼで処理し、5'末端にリン酸基を付与した。また、SV40初期プロモーターを含むプラスミドpRL-SV40 (プロメガ社、米国) を制限酵素BglIIおよびSphIで切断し、SV40初期プロモーターの基本プロモーター部分は含むが、エンハンサー部分は含まない3.5kbの断片を単離した。BS1およびSB1をアニールさせ、該断片と連結した。合成オリゴヌクレオチドに由来する配列の塩基配列を決定し、配列の過ちのないクローンを選択した。このプラスミドを「pRLSVb」と名づけた。

【0021】

p53認識配列を含む合成オリゴヌクレオチド53REF (TCGAGGGACTTGCTGGACTTGCCGTGTCGACG: 配列番号3) および53RER (GTACCGTCGACAGGCAAGTCCAGGCAAGTCCC: 配列番号4) をT4ポリヌクレオチドキナーゼで処理し、5'末端にリン酸基を付与した後、両者をアニールさせた。アニール産物の末端はXhoIおよびAsp718の突出配列と同じであり、またAsp718突出配列の隣にSalI認識配列を有する。このアニール産物を「pRLSVb」の制限酵素XhoI-Asp718部位間にクローニングした。挿入配列の塩基配列を決定し、配列の過ちのないクローンを選択した。このプラスミドを「pRLSV-p53RE1」と名づけた。

【0022】

「pRLSV-p53RE1」をSalIおよびNheI (pRLSVbプラスミド内に1カ所認識部位をもつ) で切断し、p53認識配列とアンピシリン耐性遺伝子、およびプラスミドの複製開始点を有する3.0kbの断片を単離した。また、「pRLSV-p53RE1」をXhoIおよびNheIで切断し、p53認識配列を有する0.5kbの断片を単離した。両者を連結し、「pRLSVb」のXhoI-Asp718部位間に2コピーのp53認識配列を有するプラスミド

を調製した。このプラスミドを「pRLSV-p53RE2」と名づけた。

【0023】

次に、「pRLSV-p53RE2」をSalIおよびNheIで切断し、2コピーのp53認識配列とアンピシリン耐性遺伝子、およびプラスミドの複製開始点を有する3.0kbの断片を単離した。また、「pRLSV-p53RE2」をXhoIおよびNheIで切断し、2コピーのp53認識配列を有する0.5kbの断片を単離した。両者を連結し、「pRLSVb」のXhoI-Asp718部位間に4コピーのp53認識配列を有するプラスミドを調製した。このプラスミドを「pRLSV-p53RE4」と名づけた。

【0024】

さらに、「pRLSV-p53RE4」をSalIおよびNheIで切断し、4コピーのp53認識配列とアンピシリン耐性遺伝子、およびプラスミドの複製開始点を有する3.1kbの断片を単離した。また、「pRLSV-p53RE4」をXhoIおよびNheIで切断し、4コピーのp53認識配列を有する0.6kbの断片を単離し、両者を連結した。その結果、「pRLSVb」のSV40初期プロモーター由来の基本プロモーターの上流(XhoI-Asp718部位間)8コピーのp53認識配列を有するプラスミドを調製した。このプラスミドを「pRLSV-p53RE8」と名づけた。

【0025】

1-2) ウサギβグロビン遺伝子の転写終結領域のクローニング (図2)

制限酵素XhoI、MluI、PmeIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチドRGF (TCC CTCGAGACGCGTGTGTTAAACCAATGCCCTGGCTCACAAATACC : 配列番号5)、および制限酵素SalI、MscI、NheIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチドRGR (TCCGTCGACTGGC CAGCTAGCGGCATATGTTGCCAAACTCTAAAC : 配列番号6) をプライマーに、プラスミドpBI (クロンテク社、米国) を鋳型にしたPCRを行い、pBI中のウサギβグロビン遺伝子の転写終結部位を含む領域(0.25kb)を増幅し、単離した。これを制限酵素SalIおよびXhoIで切断し、プラスミドpRLSV-p53RE8のXhoI部位にクローン化した。挿入配列の塩基配列を決定し、転写終結シグナルの方向とプロモーターの方向が一致し、かつ変異のないクローンを選択した。このプラスミドを「pRLSV-GAp53RE8」と名づけた。

【0026】

## 1-3) イントロンのクローニング (図2)

制限酵素XhoI、MluI、HindIIIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチドInF (TCCCTCGAGACGCGTAAGCTTTATTGCGGTAGTTTATCA: 配列番号7)、および制限酵素SacI、EagIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチドInR (TCCGAGCTCCGGCCGAGTACTCTAGCCTTAAGAGCTGTA: 配列番号8) をプライマーに、プラスミドpCI-neo (プロメガ社) を鋳型にしたPCRを行い、pCI-neo中のヒト・ベータグロビン遺伝子およびヒト・イムノグロブリン遺伝子のイントロンを含む領域 (0.35kb) を増幅し、単離した。これを制限酵素SacIおよびXhoIで切断し、プラスミドpSP72 (2.4kb; プロメガ社) のSacI-XhoI部位間にクローン化した。挿入配列の塩基配列を決定し、変異のないクローンを選択した。このプラスミドを「pSP-Int」と名づけた。

【0027】

## 1-4) ウシ成長ホルモン遺伝子の転写終結領域のクローニング (図2)

制限酵素SacI、PmlIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチドPA2F (TCCGAGCTCCACGTGCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGC: 配列番号9)、および制限酵素BglII、PmeI、AscIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチドPA2R (TCCAGATCTGTTTAAACGGCGGCCAAAGCCCCAAAAACAGGAAGA: 配列番号10) をプライマー、プラスミドpRc/CMV (インビトロジェン社、米国) を鋳型にしたPCRを行い、pRc/CMV中のウシ成長ホルモン遺伝子の転写終結部位を含む領域 (0.8kb) を増幅し、単離した。これを制限酵素SacIおよびBglIIで切断し、プラスミドpSP72のSacI-BglII部位間にクローン化した。挿入配列の塩基配列を決定し、変異のないクローンを選択した。このプラスミドを「pSP-pA2」と名づけた。

【0028】

## 1-5) 各ユニットの連結 (図2)

「pSP-pA2」を制限酵素SacIおよびBglIIで切断し、ウシ成長ホルモン遺伝子の転写終結部位を含む0.8kbの断片を単離した。一方、「pSP-Int」を同じく制限酵素SacIおよびBglIIで切断し、イントロン、プラスミドのレプリコン、およびアンピシリン耐性遺伝子を含む2.8kbの断片を単離した。両者を連結し、イントロンとウシ成長ホルモン遺伝子の転写終結部位を含むプラスミドを調製した。このプラスミドを「pSP-InpA2」と名づけた。

## 【0029】

「pRLSV-Gap53RE8」を制限酵素MluIおよびHindIIIで切断し、ウサギβグロビン遺伝子の転写終結部位、p53結合部位、およびSV40基本プロモーターを含む0.8 kbの断片を単離した。これを「pSP-InpA2」のMluI-HindIII部位間（イントロンの5'側に位置）にクローニングした。このプラスミドを「p53REIpA」と名づけた。「p53REIpA」はウサギβグロビン遺伝子の転写終結部位（1）-p53結合部位/SV40基本プロモーター/イントロン（2）-ウシ成長ホルモン遺伝子の転写終結部位（3）のユニットを含む。（2）-（3）間には、3つの制限酵素認識部位（EagI、SacI、PmlI）を有する。

## 【0030】

## 1-6) 遺伝子の挿入（図2）

## 1-6a) NLS（核移行シグナル）-Cre遺伝子の構築と挿入

SV40由来の核移行シグナルペプチド（PKKKRKV）に対応する塩基配列と制限酵素HindIII、EagIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチドCreF（TGAAAGCTTCGGC CGCCACCATGCCCAAGAAGAAGCGCAAGGTGTCCAATTTACTGACCGTACACCAA：配列番号11）および制限酵素SacIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチドCreR（TCCGAGCTCCTA ATCGCCATCTTCCAGCAGGCG：配列番号12）をプライマー、大腸菌BM25.8株（アマーシャム社、英国）より調製したDNAを鋳型にして、PCRを行った。BM25.8株はP1ファージの溶原株で、Cre遺伝子を含んでいる。PCR増幅産物を単離後、制限酵素EagIおよびSacIで切断し、p53REIpAのEagI-SacI部位間にクローニングした。挿入配列の塩基配列を決定し、変異のないクローンを選択した。このプラスミドを「p53RECre」と名づけた。

## 【0031】

## 1-6b) LacZ遺伝子の挿入

pCMVbeta（クロンテク社）を制限酵素NotIおよびPstIで切断後、3.5kbのDNA断片を単離した。該断片を「p53REIpA」のEagI部位にクローニングした。制限酵素切断パターンを調べ、目的の方向に挿入されたクローンを選択した。このプラスミドを「p53RELZ」と名づけた。

## 【0032】



1-7) ユニットを含む組換えアデノウイルスベクターの作製

組換えアデノウイルスの作製は、基本的に斎藤らの方法 (Miyakeら、1996、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93巻、1320-24頁；鐘ヶ江ら、バイオマニュアルシリーズ4-遺伝子導入と発現・解析法、1994、43-58頁、羊土社) に従った。以下に具体的な実施例を記す。

【0033】

アデノウイルス (Ad) 5型ゲノムのほぼ全長からE1及びE3領域を除く31kbのAdDNAを持つ42KbのコスミドpAdex1cw (鐘ヶ江ら、1994、細胞工学、13巻、8号、757-763頁) を、SwaIで切断し、ゲル濾過にて脱塩した。また、「p53RECre」または「p53RELZ」をPmeIで切断し、p53依存のCreまたはLacZ遺伝子発現ユニットを含む切断産物 (各々2.9、5.3kb) を単離した。両者をT4リガーゼによる連結反応に供した後、酵素を熱失活し、ゲル濾過にて脱塩し、SwaIによる切断反応を行った。切断産物はフェノールによる酵素失活処理後脱塩し、再びSwaIで切断した。その一部についてギガバックXLキット (ストラタジーン社、米国) によるインビトロ・パッケージングを行い、連結産物を大腸菌に導入した。得られたアンピシリン耐性形質転換株のいくつかについてコスミドを調製し、制限酵素消化によりその構造を調べ、p53依存発現ユニットが目的の方向 (E1A、E1Bの転写と逆方向) に挿入された組換えコスミドを単離した。それらを「pAxYp53RECre」、または「pAxYp53RELZ」と名づけた。

【0034】

一方、E1及びE3領域を欠くアデノウイルス5型 (Ad5 dlX株) のDNA-末端蛋白質複合体 (DNA-TPC) を斎藤らの方法 (鐘ヶ江ら、1994、バイオマニュアルシリーズ4-遺伝子導入と発現・解析法、43-58頁、羊土社) により調製した。これを制限酵素EcoT22Iで消化し、ついでゲル濾過により脱塩処理した。

【0035】

「pAxYp53RECre」 (または「pAxYp53RELZ」) とEcoT22I消化Ad5 dlXDNA-TPCを混合し、セルフェクトキット (ファルマシア社、スウェーデン) を用いて、293細胞に導入した。翌日、トランスフェクションした293細胞を懸濁し、その懸濁液、および10倍ないし100倍希釈液 (293細胞懸濁液にて希釈) を96穴プレートに

まいた。約2週間後に、293細胞内での組換えによって生じた組換えアデノウィルスの増殖が見られたウェルから、死滅細胞を含む培養液を取り出した。それを数回凍結融解し、アデノウィルス粒子を細胞から放出させた。その遠心上清液（1次ウィルス液）を、24穴プレートにまいた293細胞に感染させた。3日後に死細胞を含む培養液を取り出し、一部は1次ウィルス液作成の要領で凍結融解し、遠心上清液を得た（2次ウィルス液）。残りの培養液を遠心し、細胞を得た。それよりDNAを調製し、制限酵素切断によって組換えアデノウィルスDNAの構造を検討し、目的の構造が確認されたクローンを選択した。それらを各々、「AxYp53RECre」、「AxYp53RELZ」と名づけた。その2次ウィルス液を用いて、より多量の293細胞に感染させた。その培養液を同様に凍結融解、遠心し、3次ウィルス液を得た。3次ウィルス液について、斎藤らの方法（鐘ヶ江ら、1994、バイオマニュアルシリーズ4-遺伝子導入と発現・解析法、43-58頁、羊土社）により、力価を測定した。

## 2) p53発現組換えアデノウィルスベクターの作製

### 2-1) p53cDNAのクローニング

ヒトの精巣由来polyA(+)RNA（クロンテク社）を鋳型、オリゴdTをプライマーに用いて、スーパースクリプト・プレアンプリフィケーションシステム（ギブコ・ビーアールエル社、米国）による1本鎖cDNA合成を行った。そのcDNA混合物を鋳型、制限酵素XbaIの認識配列を含むオリゴヌクレオチド・P53F（AGCTTCTAGACAGCCAGACTGCCTTCCGGGTCAGTGC：配列番号13）および制限酵素XbaIの認識配列を含むオリゴヌクレオチド・P53R（GTTCTAGACCCCATGTAATAAAAGGTG：配列番号14）をプライマーとしてPCRを行った。増幅産物を制限酵素XbaIで切断し、p53のオープンリーディングフレームを含むDNA断片（1.7kb）を単離し、pBluescriptII SK(-)プラスミド（ストラタジーン社）のXbaI部位にクローニングした。挿入配列の塩基配列を決定し、アミノ酸レベルで変異のないクローンを選択した。このプラスミドを「pBS-p53」と名づけた。

【0036】

### 2-2) 組換えアデノウィルスベクターの作製

「pBS-p53」をXbaIで切断し、p53cDNAを含む断片を単離し、末端部をDNAブラ

ンティングキット（宝酒造社、日本）にて平滑化した。また、Ad5型ゲノムのほぼ全長からE1及びE3領域を除く31kbのAdDNA、およびCAGプロモーター・転写終結領域を持つ44KbのコスミドpAdex1CA（鐘ヶ江ら、1994、細胞工学、13巻、8号、757-763頁）を、SwaIで切断し、ゲル濾過にて脱塩した。

### 【0037】

これらp53cDNA、コスミド両断片を用いて、1-7)と同様にして組換えコスミドを作製した。これを「pAxCAyp53」と名づけた。これを用いて、1-7)項に記した方法で、CAGプロモーター-p53遺伝子-転写終結領域を含む組換えアデノウィルスを作製した。これら組換えアデノウィルスを「AxCAyp53」と名づけた。

### 3) レポーター用アデノウィルスベクターの構築

#### 3-1) CMVエンハンサー／プロモーターのクローニング（図3）

制限酵素Asp718、AscI、ScaI、FseIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチド・CMF（TCAGGTACCGGCGCGCCAGTACTGGCCGGCCCGTTACATAACTTACGGTAAATGG：配列番号15）および制限酵素EcoRIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチド・CMR（TCCGAATTCGTACAATTCCGCAGCTTTTAGAGC：配列番号16）をプライマーに、プラスミドpCMVbeta（クロンテック社、米国）を鋳型にしたPCRを行い、pCMVbetaのエンハンサー／プロモーター／イントロン領域（サイトメガロウィルスの最初期プロモーターのエンハンサーとプロモーター+SV40ウィルスのイントロン；0.8kb）を増幅し、単離した。該断片を制限酵素Asp718およびEcoRIで切断後、pBluescriptII SK(-)プラスミド（ストラタジーン社）のAsp718-EcoRI部位間にクローニングした。挿入配列の塩基配列を決定し、変異のないクローンを選択した。このプラスミドを「pBS-CMV」と名づけた。

### 【0038】

#### 3-2) SV40ウィルス後期遺伝子転写終結領域のクローニング（図3）

制限酵素SacII、Sse8387Iの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチド・PA3F（TGCCGCGGCCTGCAGGCAGACATGATAAGATACATTGATG：配列番号17）および制限酵素SacI、ScaI、AscIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチド・PA3R（TCCGAGCTCAGTACTGGCGCGCCAAAAAACCTCCACACCTCCCCCT：配列番号18）をプライマーに、プラスミド「pCMVbeta」を鋳型にしたPCRを行い、「pCMVbeta」中のSV40ウィルス後期遺

伝子転写終結領域 (0.2kb) を増幅し、単離した。該断片を制限酵素SacIおよびSacIIで切断後、pBluescriptII SK(-)のSacI-SacII部位間にクローニングした。挿入配列の塩基配列を決定し、変異のないクローンを選択した。このプラスミドを「pBS-pA3」と名づけた。

【0039】

### 3-3) loxP配列の合成とクローニング (図3)

loxP配列と制限酵素EcoRI、SmaI、NotIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチドL1F (AATTCATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATCCCGGGGC : 配列番号19) およびL1R (GGCCGCCCGGGGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATG : 配列番号20) をT4ポリヌクレオチドキナーゼで処理し、5'末端にリン酸基を付与した。その後両者をアニールさせた後、pBS-CMVのEcoRI-NotI部位間にクローニングした。挿入配列の塩基配列を決定し、配列の過ちのないクローンを選択した。このプラスミドを「pBS-CMVL」と名づけた。

【0040】

また、loxP配列と制限酵素NotI、SalI、SpeI、Sse8387Iの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチドL2F (GGCCGCGTCGACATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATACTAGTCCTGCA : 配列番号21) およびL2R (GGACTAGTATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGTCGACGC : 配列番号22) を同様にT4ポリヌクレオチドキナーゼで処理し、アニールさせた後、「pBS-pA3」のSse8387I-NotI部位間にクローニングした。挿入配列の塩基配列を決定し、配列の過ちのないクローンを選択した。このプラスミドを「pBS-LpA3」と名づけた。

【0041】

### 3-4) レポーター構築用プラスミドベクターの作製 (図3)

「pBS-CMVL」を制限酵素Asp718およびNotIで切断し、CMVプロモーター部分およびloxP配列を含む0.9kbの断片を単離した。また、「pBS-LpA3」をAsp718およびNotIで切断し、loxP配列、SV40ウィルス後期遺伝子転写終結領域、およびプラスミドの複製開始領域と選択マーカを含む3.2kbの断片を単離した。両断片が連結されたプラスミドを単離し、「pBS-CLLA」と名づけた。このプラスミドはCMVエンハンサー／プロモーター／SV40イントロン領域-2つのloxP-SV40ウィルス後

期遺伝子転写終結領域からなるユニットを含む。2つのloxPの間には制限酵素SmaI（またはXmaI）、NotI、およびSalIの認識配列が配されている。

#### 【0042】

3-5) ベータ・ガラクトシダーゼ遺伝子を含むレポーターベクターの作製（図3）

プラスミド「pCMVbeta」を制限酵素SmaI、NotI、およびPstIで切断後、大腸菌のベータ・ガラクトシダーゼ遺伝子を含む3.4kbの断片を単離した。この断片を「pBS-CLLA」のSmaI-NotI部位間にクローニングした。このプラスミドを「pLoxLZ」と名づけた。

#### 【0043】

3-6) ベータ・ガラクトシダーゼ遺伝子とG418耐性遺伝子を発現するプラスミドの作製（図3）

大腸菌のベータ・ガラクトシダーゼ（LacZ）遺伝子とG418耐性（Neo）遺伝子とを同時に発現するプラスミドの作製を行った。

#### 【0044】

そのため、pLoxLZの第2（3'側）のloxP配列と転写終結領域との間にIRES（Internal Ribosome Entry Site）配列に連結したG418耐性遺伝子を挿入した。IRES配列は、ウィルスによく見られる配列で、リボソームの結合配列を有する。この下流に位置する遺伝子は、転写されれば、CAP構造が付近になくとも、効率的に翻訳される。従って、一つの転写単位から複数の遺伝子産物を発現させることが出来る。

#### 【0045】

制限酵素SpeI、BspHIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチド・NeF（TCCACTAGTTCATGATTGAACAAGATGGATTGCAC：配列番号23）および制限酵素EcoRI、Sse8387I、BamHIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチド・NeR（TTCCGAATTCCTGCAGGGGATCCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCG：配列番号24）をプライマーに、プラスミドpCI-neo（プロメガ社、米国）を鋳型とするPCRを行い、pCI-neo中のG418耐性遺伝子（0.8 kb）を増幅し、単離した。該断片を制限酵素SpeIおよびEcoRIで切断後、pBluescriptII SK(-)のSpeI-EcoRI部位間にクローニングした。挿入配列の塩基配

列を決定し、変異のないクローンを選択した。このプラスミドを「pBS-Neo」と名づけた。

【0046】

また、制限酵素SpeIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチド・IRF (TCCACTA GTGTTATTTTCCACCATATTGCCGTC : 配列番号25) および制限酵素BamHI、NcoIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチド・IRR (TCAGGATCCCCATGGCCATGGTATTATCATCGT : 配列番号26) をプライマー、プラスミドpCITE-2(a) (ノバジェン社、米国) を鋳型とするPCRを行い、pCITE-2(a)中のIRES領域 (0.5 kb) を増幅し、単離した。該断片を制限酵素SpeIおよびBamHIで切断後、pBluescriptII SK(-)のSpeI-BamHI部位間にクローニングした。挿入配列の塩基配列を決定し、変異のないクローンを選択した。このプラスミドを「pBS-IRES」と名づけた。

【0047】

「pBS-IRES」を制限酵素SpeIおよびNcoIで切断し、IRES領域を含む0.5kbの断片を単離した。この断片を「pBS-Neo」のSpeI-BspHI部位間 (G418耐性遺伝子の5'末端に位置) にクローニングし、IRES領域の3'末端にG418耐性遺伝子が連結されたプラスミドを作製した。このプラスミドを「pBS-IRNeo」と名づけた。

【0048】

次に、「pBS-IRNeo」を制限酵素SpeIおよびSse8387Iで切断し、IRES領域およびG418耐性遺伝子を含む0.8kbの断片を単離し、pLoxLZのSpeI-Sse8387I部位間 (2番目のloxPとSV40ウィルス後期遺伝子転写終結領域の間に位置) にクローニングした。得られたプラスミドを「pLoxLZIRNeo」と名づけた。このプラスミドは、CMVエンハンサー／プロモーター／SV40イントロン領域-loxP-LacZ-loxP-IRES-Neo-SV40ウィルス後期遺伝子転写終結領域の構造を持つ。

【0049】

3-7) ルシフェラーゼ遺伝子を含むレポーターベクターの作製

プラスミドpGEM-luc (プロメガ社、米国) を制限酵素NotI、およびSalIで切断後、ホタルのルシフェラーゼ遺伝子を含む1.7kbの断片を単離した。この断片を「pBS-CLLA」のNotI-SalI部位間にクローニングした。このプラスミドを「pLoxIuc」と名づけた。

## 【0050】

## 3-8) レポーター用アデノウィルスベクターの構築

「pLoxLZ」、または「pLoxluc」を制限酵素ScaIで切断し、CMVエンハンサー／プロモーター／SV40イントロン領域-loxP-LacZ（またはルシフェラーゼ遺伝子）-loxP-IRES-Neo-SV40ウィルス後期遺伝子転写終結領域を含む4.6kb、または2.7kbのDNA断片を単離した。この断片を、1-7) に記した方法でpAdex1cwのSwaI部位に挿入し、組換えコスミドを得た。これらを「pAxYCMLLZ」、または「pAxYCMLluc」と名づけた。これを用いて、1-7) に記した方法で、上記ユニットを含む組換えアデノウィルスを作製した。これら組換えアデノウィルスを「AxYCMLLZ」、または「AxYCMLluc」と名づけた。

## 【0051】

## [実施例2] 評価用細胞の作製

p53を欠損するヒトの骨肉腫由来の細胞Saos2（ATCCセルライン・アンド・ハイブリドーマズ、第8版、1994、282頁、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション）に、CMVエンハンサー／プロモーター／SV40イントロン領域-loxP-LacZ-loxP-IRES-Neo-SV40ウィルス後期遺伝子転写終結領域からなるユニットの挿入を試みた。

## 【0052】

プラスミド「pLoxLZIRNeo」を制限酵素BsaI（上記ユニット以外の領域を切断）で切断し、直鎖状にした。0.4cm幅のジーンバルサーキューベット（バイオラッド社、米国）に、K-PBSバッファー（岩本ら、バイオマニュアルシリーズ4-遺伝子導入と発現・解析法、1994、23-28頁、羊土社）に懸濁したSaos2懸濁液（ $1 \times 10^7$  cells/ ml）0.4 ml、およびBsaI切断「pLoxLZIRNeo」0.01 mgを入れ、ジーンバルサーII（バイオラッド社）により250 V、0.95 mFDのパルスをかけた。その後懸濁液に培地（マッコイ5A + 15% 胎仔牛血清）9mlを加え、37℃で培養した。3日後、細胞をトリプシン処理によりG418を0.8 mg/ml含む培地に懸濁し、10cmディッシュ10枚にまいてさらに培養を続けた。その17日後に、コロニーを複数単離し、G418を0.4 mg/ml含む0.4 mlの培地に懸濁して、48穴のプレートに入れ、培養を続けた。このようなG418耐性クローンのいくつかについて、X-gal染色を

行い、LacZの発現の良好なクローンを選択した。これらG418耐性かつLacZ (+)のクローンのいくつかについてゲノムDNAを調製し、適当な制限酵素で切断し、ナイロンメンブレンにブロットした。これを、標識したLacZ遺伝子DNAとハイブリダイズさせ、その強度から、1細胞当たりの挿入ユニット数を推定した。挿入ユニット数が1と判定されたクローン (A8aと名づけた) を以後の実験に用いた。

【0053】

### 【実施例3】発現試験

#### 1) p53依存プロモーターによる発現

アデノウィルスベクターに搭載した状態でのp53依存プロモーターの誘導能を検討した。前日にSaos2またはヒト胎児包皮由来細胞であるHs68 (ATCCセルライン・アンド・ハイブリドーマズ, 第8版, 1994, 282頁, アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション) をウェル当たり  $4 \times 10^5$  細胞播種した6穴プレートに対し、「AxYp53RELZ」、および「AxCAYp53」を標記のMOI (multiplicity of infection) で感染させた。感染方法は、鐘ヶ江らの方法 (バイオマニュアルシリーズ4-遺伝子導入と発現・解析法, 1994, 43-58頁, 羊土社) に従った。3日後に感染細胞の粗抽出液を調製し、ガラクトンプラスキット (トロピクス社、米国) を用いて、 $\beta$ ガラクトシダーゼ活性を測定した。表1にその結果を示す。

【0054】

【表1】

No	細胞	AxCAYp53 (MOD)	AxYp53RELZ (MOD)	$\beta$ ガラクトシダーゼ (RLU/ug)
1	Saos2 (p53-)	0	0	0
2		0	100	12
3		10	0	0
4		10	100	284611
5	Hs68 (p53+)	0	0	0
6		0	100	347741
7		10	0	0
8		10	100	452385

このプロモーターはp53により強力に誘導されること、また、p53陽性細胞の場合、内在性p53のみでp53依存プロモーターが十分に誘導されることが示された。



## 2) p53依存の発現抑制；評価系1

CMVプロモーター-loxP-LacZ遺伝子-loxP-転写終結シグナルからなるユニットが細胞のゲノムに挿入されたp53欠損細胞「A8a」、「AxCAYp53」、および「AxYp53RELZ」を用いて、p53依存のLacZ発現の抑制を検討した。前日にA8aをウェル当たり  $4 \times 10^5$  細胞播種した6穴プレートに対し、各種組換えアデノウィルスを標記のMOIで感染させた。7日後に感染細胞の粗抽出液を調製し、1)と同様にβガラクトシダーゼ活性を測定した。表2に相対活性で表したその結果を示す。

【0055】

【表2】

No	細胞	AxCAYp53 (MOD)	AxYp53RELZ (MOD)	βガラクトシダーゼ (ratio)
1	A8a	0	0	1
2		0	100	0.91
3	A8a	30	0	1
4		30	100	0.17

この細胞では、p53-のときには「AxYp53RELZ」による発現抑制は見られないが、p53を発現させた場合には「AxYp53RELZ」による発現抑制が観察された。

## 3) p53依存の発現抑制；評価系2

CMVプロモーター-loxP-LacZ遺伝子（またはルシフェラーゼ遺伝子）-loxP-転写終結シグナルからなるユニットを含む組換えアデノウィルス（「AxYCMLLZ」、または「AxYCMLluc」）、「AxCAYp53」、および「AxYp53RECre」を用いて、p53依存のLacZ発現の抑制を検討した。前日にSaos2をウェル当たり  $4 \times 10^5$  細胞播種した6穴プレートに対し、「AxCAYp53」および「AxYp53RECre」を標記のMOIで感染させた。その翌日、「AxYCMLLZ」、または「AxYCMLluc」を感染させた。その5日後に感染細胞の粗抽出液を調製し、1)と同様にβガラクトシダーゼ活性、またはプロメガ社製アッセイシステムによりルシフェラーゼ活性を測定した。表3および4に相対活性で表したその結果を示す。

【0056】

【表3】

No	細胞	AxYCMLLZ (MOI)	AxCAYp53 (MOD)	AxYp53RECre (MOD)	βガラクトシダーゼ (ratio)
1	Saos2	10	0	0	1
2		10	0	100	1.47
3	Saos2	10	10	0	1
4		10	10	100	0.09

【0057】

【表4】

No	細胞	AxYCMLluc (MOD)	AxCAYp53 (MOD)	AxYp53RECre (MOD)	ルシフェラーゼ (ratio)
1	Saos2	3	0	0	1
2		3	0	100	0.94
3	Saos2	3	10	0	1
4		3	10	100	0.12

2)と同様に、この細胞ではp53-のときには「AxYp53RECre」による発現抑制は見られないが、p53を発現させた場合には「AxYp53RECre」による顕著な発現抑制が観察された。

#### 4) p53依存の発現抑制；評価系3

CMVプロモーター-loxP-LacZ遺伝子-loxP-転写終結シグナルからなるユニットを含む組換えアデノウイルス、および各種p53+ (Hs68、IMR90(ヒト肺由来細胞；ATCCセルライン・アンド・ハイブリドーマズ,第8版,1994,100頁,アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション)) または-細胞 (Saos2、J82(ヒト膀胱癌由来；ATCCセルライン・アンド・ハイブリドーマズ,第8版,1994,239頁,アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション)) を用いて、p53によるLacZ発現の抑制を検討した。前日に各種のp53+または-細胞をウェル当たり  $4 \times 10^5$  細胞播種した6穴プレートに対し、「AxYp53RECre」を標記のMOIで感染させた。その翌日、「AxYCMLLZ」を感染させた。その5日後に感染細胞の粗抽出液を調製し、3-1項と同様にβガラクトシダーゼ活性を測定した。表5に相対活性で表したその結果を示す。

【0058】

【表5】

No	細胞	AxYCMLLZ (MOD)	AxYp53RECre (MOD)	βガラクトシダーゼ (ratio)
1	Saos2 (p53-)	3	0	1
2		3	100	1.31
3	J82 (p53-)	3	0	1
4		3	100	0.59
5	Hs68 (p53+)	3	0	1
6		3	100	0.091
7	IMR90 (p53+)	3	0	1
8		3	100	0.006

p53欠損細胞であるSaos2、J82では「AxYp53RECre」による発現抑制はほとんど見られないが、p53発現細胞であるHs68、IMR90では、「AxYp53RECre」による顕著な発現抑制が観察された。

【0059】

【発明の効果】

本発明により、（１）特定の転写因子の存在下で作動するプロモーターと該プロモーター支配下に存在する組換え酵素をコードする遺伝子と（２）発現可能な任意の遺伝子と該遺伝子周辺に存在する組換え酵素の２つの標的配列（但し、該２つの標的配列の間で組換えが起こった際に、該任意の遺伝子の発現が起こらなくなるように、該任意の遺伝子と該２つの標的配列が配置されている）とを有するベクターが提供された。これにより特定の転写因子が存在しない細胞に特異的に任意の遺伝子を発現させることが可能となった。

【0060】

本発明のベクターは、特に癌治療に好適に用いられる。即ち、本発明のベクターは、①組み換え酵素とその認識配列の組み合わせを用いて転写以前のステップで遺伝子発現の制御を行うため、Balmainらのシステム（Balmainら、W097/12970）のように発現強度や発現の特異性に対する問題もなく、②触媒量の組み換え酵素の発現により目的遺伝子を物理的に発現不能の状態にする遺伝子発現の不可逆的破壊システム「スイッチOFFシステム」を用いているため、上記の佐藤等の「

スイッチONシステム」(佐藤ら、1997、第3回日本遺伝子治療学会講演要旨集、p 49)のように、用いるプロモーターにより影響される特異性や正常細胞への毒性といった問題点も少ないことから、本発明のベクターを用いれば、広範囲の癌に対して特異的かつ安全に癌治療を行うことが可能である。

【0061】

【配列表】

配列番号： 1

配列の長さ： 28

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

GATCTCTCGA GCCCGGGGGT ACCGCATG

28

配列番号： 2

配列の長さ： 20

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

CGGTACCCCC GGGCTCGAGA

20

配列番号： 3

配列の長さ： 32

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TCGAGGGACT TGCCTGGACT TGCCTGTCGA CG

32

配列番号： 4

配列の長さ： 32

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

GTACCGTCGA CAGGCAAGTC CAGGCAAGTC CC

32

配列番号： 5

配列の長さ： 46

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TCCCTCGAGA CGCGTGTTTA AACCAATGCC CTGGCTCACA AATACC

46

配列番号： 6

配列の長さ： 45

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TCCGTCGACT GGCCAGCTAG CGGCATATGT TGCCAAACTC TAAAC

45

配列番号： 7

配列の長さ： 39

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TCCCTCGAGA CGCGTAAGCT TTATTGCGGT AGTTTATCA

39

配列番号： 8

配列の長さ： 39

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TCCGAGCTCC GGCCGAGTAC TCTAGCCTTA AGAGCTGTA

39

配列番号： 9

配列の長さ： 36

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TCCGAGCTCC ACGTGCTGTG CCTTCTAGTT GCCAGC

36

配列番号： 10

配列の長さ： 46

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TCCAGATCTG TTAAACGGC GCGCCAAAGC CCCAAAAACA GGAAGA

46

配列番号： 11

配列の長さ： 68

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TGAAAGCTTC GGCCGCCACC ATGCCCAAGA AGAAGCGCAA GGTGTCCAAT TTACTGACCG

60

TACACCAA

68

配列番号： 12

配列の長さ： 33

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TCCGAGCTCC TAATCGCCAT CTTCCAGCAG GCG

33

配列番号： 13

配列の長さ： 37

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状



配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

AGCTTCTAGA CAGCCAGACT GCCTTCCGGG TCACTGC

37

配列番号： 14

配列の長さ： 27

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

GTTCTAGACC CCATGTAATA AAAGGTG

27

配列番号： 15

配列の長さ： 55

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TCAGGTACCG GCGCGCCAGT ACTGGCCGGC CCGTTACATA ACTTACGGTA AATGG

55

配列番号： 16

配列の長さ： 33

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TCCGAATTCG TACAATTCCG CAGCTTTTAG AGC

33

配列番号: 17

配列の長さ: 41

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の特徴: 他の核酸 合成DNA

配列

TTGCCGCGGC CTGCAGGCAG ACATGATAAG ATACATTGAT G

41

配列番号: 18

配列の長さ: 47

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の特徴: 他の核酸 合成DNA

配列

TCCGAGCTCA GTACTGGCGC GCCAAAAAAC CTCCCACACC TCCCCCT

47

配列番号: 19

配列の長さ: 47

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の特徴: 他の核酸 合成DNA

配列

AATTCATAAC TTCGTATAGC ATACATTATA CGAAGTTATC CCGGGGC

47

配列番号： 20

配列の長さ： 47

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

GGCCGCCCCG GGATAACTTC GTATAATGTA TGCTATACGA AGTTATG

47

配列番号： 21

配列の長さ： 58

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

GGCCGCGTCG ACATAACTTC GTATAGCATA CATTATACGA AGTTATACTA GTCCTGCA

58

配列番号： 22

配列の長さ： 50

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

GGACTAGTAT AACTTCGTAT AATGTATGCT ATACGAAGTT ATGTCGACGC

50

配列番号： 23

配列の長さ： 35

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TCCACTAGTT CATGATTGAA CAAGATGGAT TGCAC

35

配列番号： 24

配列の長さ： 48

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TTCCGAATTC CCTGCAGGGG ATCCTCAGAA GAACTCGTCA AGAAGGCG

48

配列番号： 25

配列の長さ： 33

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TCCACTAGTG TTATTTTCCA CCATATTGCC GTC

33

配列番号： 26

配列の長さ： 33

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TCAGGATCCC CATGGCCATG GTATTATCAT CGT

33

【図面の簡単な説明】

【図1】

pRLSVb-p53RE8の構築過程を示す図である。

【図2】

p53依存Cre発現ユニットの構築過程を示す図である。

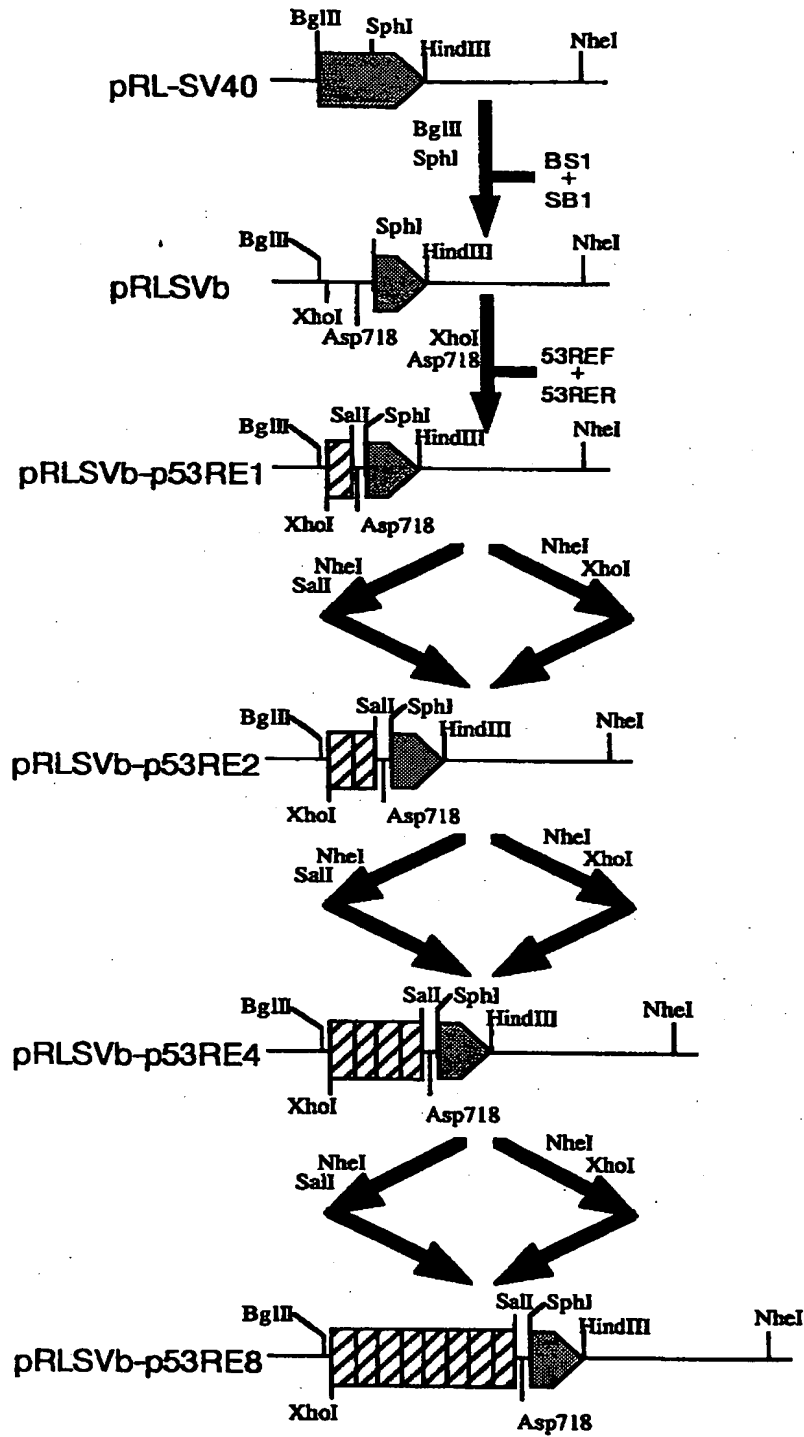
【図3】

レポーターユニットの構築過程を示す図である。

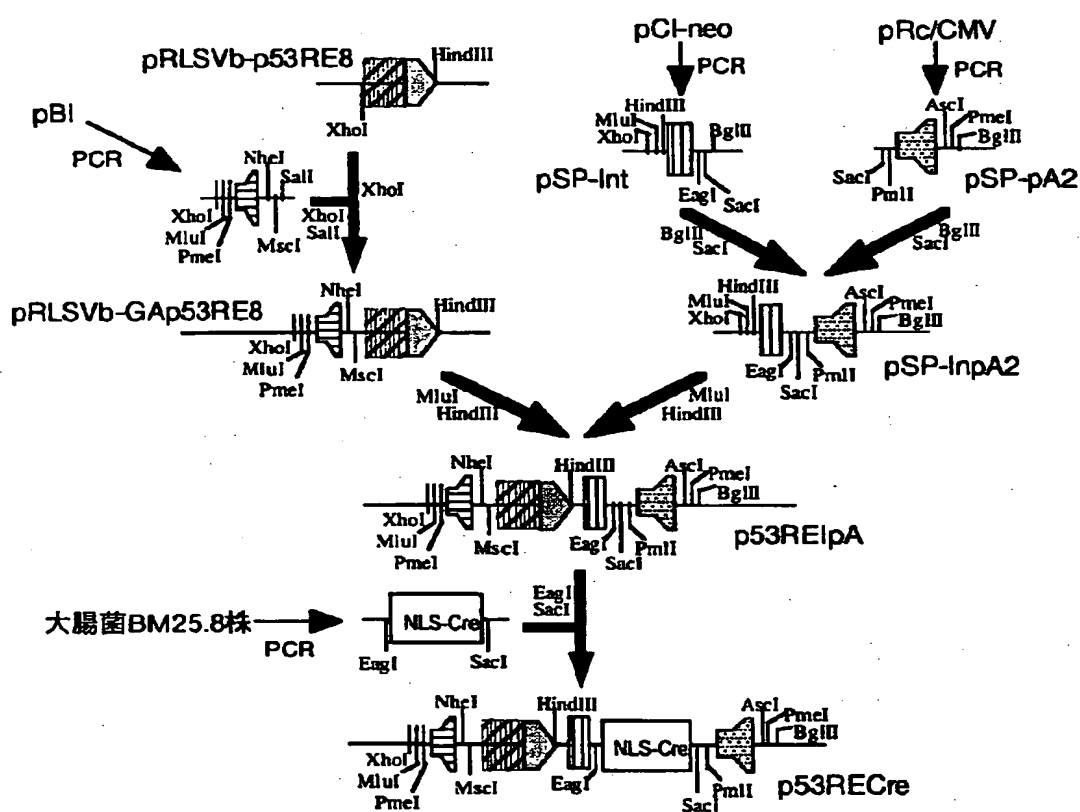
【書類名】

図面

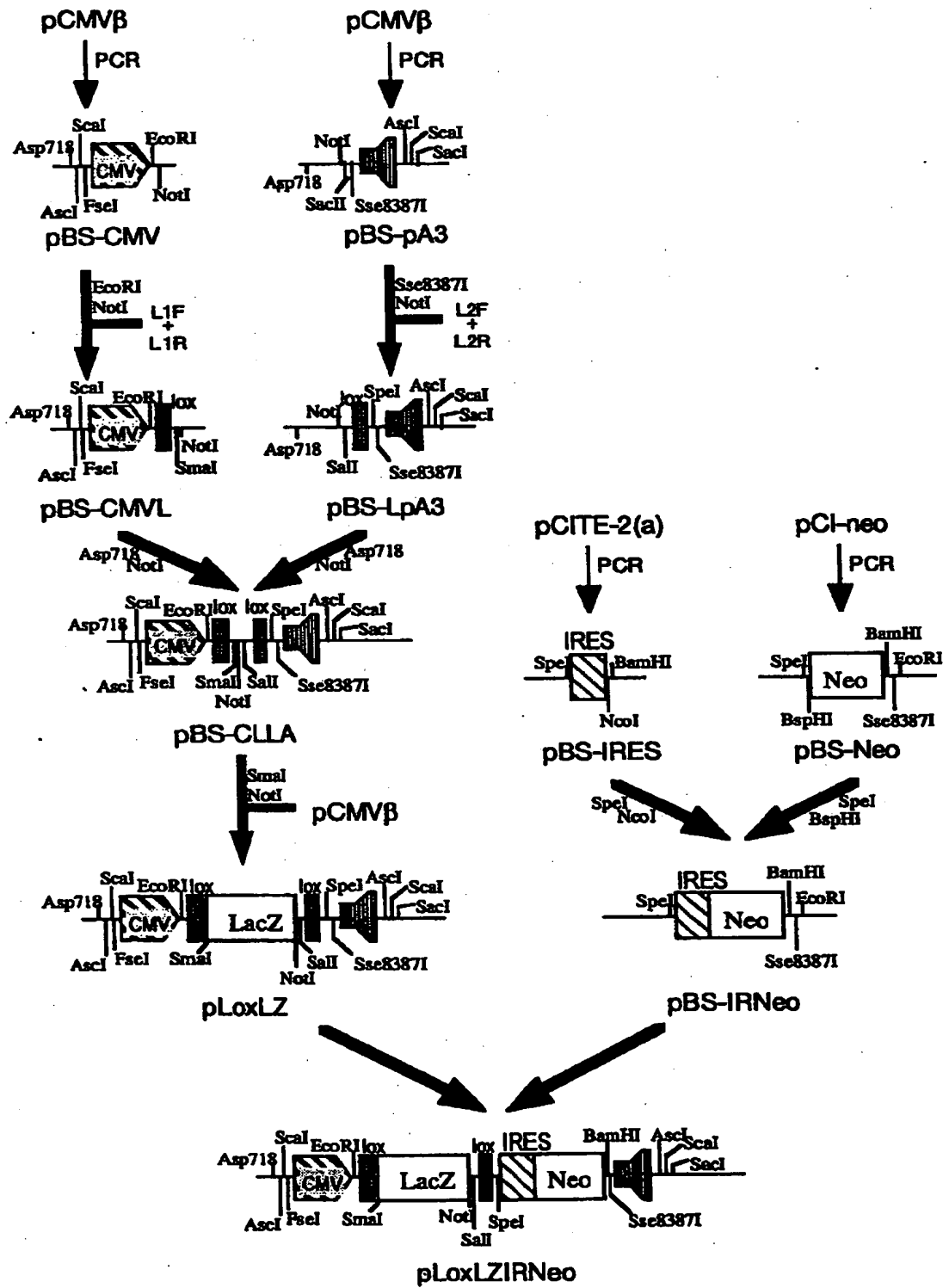
【図1】



【図2】



【図3】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 特定の転写因子が存在しない細胞に特異的に任意の遺伝子を発現させる技術を提供することを課題とする。さらに、この技術を利用した、癌細胞に高い特異性を有し、正常細胞に対する悪影響が少ない、遺伝子発現技術を提供することを課題とする。

【解決手段】 特定の転写因子に依存するプロモーターの下流に組み換え酵素遺伝子を配置した組み換え酵素の発現ユニットと、他のプロモーターの下流に発現させるべき所望の遺伝子と組換え酵素の2つの標的配列を配置したユニットとを作製し、これらユニットを細胞に感染させることにより、特定の転写因子が存在する細胞では組み換え酵素が発現し認識配列間の組換えが起こるため目的遺伝子が欠失して遺伝子の発現が起こらないが、特定の転写因子が存在しない細胞では組み換え酵素が発現せず認識配列間の組換えが起こらないため目的遺伝子の発現が引き起こされるという、特定の転写因子が存在しない細胞に特異的な遺伝子発現技術を見いだした。

【選択図】 なし

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

595155107

【住所又は居所】

茨城県つくば市観音台1丁目25番11号

【氏名又は名称】

株式会社ディナベック研究所

【代理人】

申請人

【識別番号】

100102978

【住所又は居所】

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階

清水国際特許事務所

【氏名又は名称】

清水 初志

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [595155107]

1. 変更年月日 1995年11月 1日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号  
氏 名 株式会社ディナベック研究所

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**